

**CONSTITUTION:** Methane is brought into contact with a complex metal oxide catalyst comprising an oxygen carrier and/or an alkaline earth metal. Co and Fe in the absence of oxygen to prepare especially ethane and ethylene at an extremely high production rate and in a high selectivity, especially in the selectivity of  $\geq 90\%$ . The complex catalyst is prepared by the process comprising mixing the nitrate aqueous solutions of the alkaline earth metal, Co and Fe with each other, adding citric acid and ethylene glycol to the mixture, heating the mixture in a rotary evaporator at  $100^{\circ}\text{C}$  until the generation of nitrogen oxide gases ceases, drying the resultant sol at  $200^{\circ}\text{C}$  and subsequently heating the dry product. The method readily gives a gas containing the ethane and the ethylene without requiring a condensation process.

(Encl. 1)

JP 3-287545

(Translation of Pertinent Parts of Citation 2)

Page 310, upper right column, lines 15-19:

A target- directing polymeric drug compound according to the present invention can contain, intra-molecularly, a large amount of drug ingredients which are stably bonded to the compound. The compound is capable of efficiently delivering a large volume of drug ingredients to a diseased or target part of a human body.

Page 311, lower right column, lines 8-13:

The drugs which can be used include for example, anti-cancer agents such as adriamycin, daunomycin, methotrexate and mitomycin C; central nervous system drugs; peripheral nervous system drugs; drugs for allergic diseases; circulatory drugs; respiratory system drugs; digestive system drugs; hormone preparations; metabolic drugs; antibiotics; chemitherapeutics and the like.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-287545

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 47/48  
31/71  
31/785  
39/395  
C 07 H 15/252  
C 08 G 65/32  
69/40

識別記号

Z  
ADU  
NQJ  
NSP

庁内整理番号

7624-4C  
7431-4C  
7431-4C  
8829-4C  
7822-4C  
8016-4J  
9053-4J

⑬公開 平成3年(1991)12月18日

審査請求 有 請求項の数 9 (全11頁)

⑭発明の名称 標的指向性高分子医薬化合物及びその中間体

⑰特 願 平2-85492

⑱出 願 平2(1990)3月31日

⑲発明者	桜井	靖久	東京都杉並区永福3-17-6
⑲発明者	岡野	光夫	千葉県市川市国府台6-12-12
⑲発明者	片岡	一則	千葉県柏市大室1083-4
⑲発明者	井上	祥平	東京都豊島区千早4-18-5-206
⑲発明者	横山	昌幸	東京都品川区東大井5-26-25
⑲出願人	新技術事業団		東京都千代田区永田町2丁目5番2号
⑲代理人	弁理士 平木 祐輔		

## 明細書

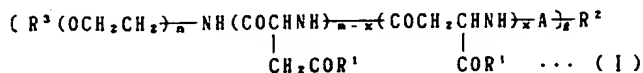
## 1. 発明の名称

標的指向性高分子医薬化合物及びその中間体

## 2. 特許請求の範囲

1. 親水性セグメント及び薬物を結合せしめた薬理機能セグメントを有するブロック(又はグラフト)コポリマーの親水性セグメント以外の部位と標的指向性物質(即ち、生体内の所望部位又は成分に対して高い親和性を有する物質)とを直接又は結合鎖を介して結合させてなる標的指向性高分子医薬化合物。

## 2. 一般式(I)

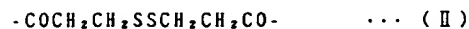


(式中、 $l$  は 1 ~ 30、 $n$  は 5 ~ 400、 $m$  は 1 ~ 300、 $x$  は 0 ~ 300 の整数を示し、 $R^1$  は分子中に  $m$  個あり、同一又は相異なって OH、及び薬物残基から選ばれる残基を示すが、 $R^1$  の少なくとも 1 個以上は薬物残基を示し、 $R^2$  は標的指向性物質残基を示し、 $R^3$  は  $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、などを示し、 $A$

は直接結合又は結合反応に用いられたカップリング剤に起因する結合鎖を示す。)

で示される請求項 1 記載の標的指向性高分子医薬化合物。

3. 標的指向性物質が抗体であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
4. 薬物が抗ガン剤であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
5. カップリング剤に起因する結合鎖  $A$  が式(II)

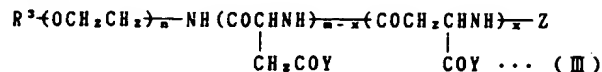


で示される 2 価の鎖状化合物残基であることを特徴とする請求項 2 ~ 4 記載の標的指向性高分子医薬化合物。

6. 標的指向性物質残基  $R^2$  と結合鎖  $A$  との結合がアミド結合であることを特徴とする請求項 2 ~ 5 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
7. 抗ガン剤がアドリアマイシンであることを特徴とする請求項 4 ~ 6 記載の標的指向性高分子医薬化合物。

8. 親水性セグメントと薬物及び／又は標的指向性物質を結合する能力のある官能基保有セグメントとを有するブロック（又はグラフト）コポリマーからなる標的指向性高分子医薬化合物合成用中間体。

### 9. 一般式(Ⅲ)



（式中、n は 5 ～ 400、m は 1 ～ 300、x は零又は 1 ～ 300 の整数を示し、Y は同一又は相異なっており OH 及び薬物残基から選ばれる残基を示し、

Z は  $-COCH_2CH_2SH$  又は  $-COCH_2CH_2SS$



を示し、 $R^3$  は  $CH_3$ 、 $C_2H_5$  などを示す）

で示されるブロックコポリマー誘導体からなることを特徴とする請求項 8 記載の標的指向性高分子医薬化合物合成用中間体。

### 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は標的指向性高分子医薬化合物及びその

疎水性薬物を多量に結合させた薬理機能セグメントを中心としてその外側を親水性セグメント（即ち親水性高分子鎖で包囲した状態のミセルを形成して薬物及び標的指向性物質の結合が安定化され、水中に高濃度で可溶化され、しかも高分子医薬品の場合問題となる抗原性が殆ど認められない優れた特性を有する標的指向性高分子医薬化合物が提供される。

〔従来の技術〕

低分子薬物と標的指向性物質とを結合させて標的指向性医薬化合物を製造する際、高分子鎖を中間支持体として両成分を結合させることにより、両成分の結合による機能低下を防ごうとする試み及び目的とする標的指向性医薬化合物の水溶性を損なうことなく多量の薬物を結合させようとする試みは従来、幾つかなされてきた。

しかしながら、従来の試みで用いられた高分子鎖は単一成分からなるホモポリマーか、2 種の成分を交互又は順不同に重合させた物であり、それらの高分子鎖を用いて製造された標的指向性医薬

中間体に関するものである。

更に詳しくは、本発明の第 1 の目的は親水性セグメント及び薬物を結合せしめた薬理機能セグメントを有するブロック（又はグラフト）コポリマーの親水性セグメント以外の部位と標的指向性物質（即ち、生体内の所望部位又は成分に対して高い親和性を有する物質）とを直接又は結合鎖を介して結合させてなる標的指向性高分子医薬化合物を提供することにある。

本発明の第 2 の目的は親水性セグメントと薬物及び／又は標的指向性物質を結合する能力のある官能基保有セグメントとを有するブロック（又はグラフト）コポリマーからなる標的指向性高分子医薬化合物合成用中間体を提供することにある。

本発明の標的指向性高分子医薬化合物は分子内に多量の薬物を安定に結合保有させることが出来、且つその多量の薬物を生体内の治療部位又は標的に向かって効率的に到達させる能力を有するものである。

本発明によれば、薬物が疎水性物質の場合でも

化合物は必ずしも医薬品として満足出来るものではなかった。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来の高分子鎖を中間支持体として用いて製造された標的指向性高分子医薬化合物は薬効を上昇させるために疎水性薬物の担持量を多くすると水溶性が低下する欠点があった。

本発明の課題は、従来の高分子鎖に代えて新規な構造の高分子鎖を用いることにより従来の欠点を解消し、薬物の担持量を多くしても水溶性が低下せず、高い薬効及び標的指向性を保持する標的指向性高分子医薬化合物を提供することにある。

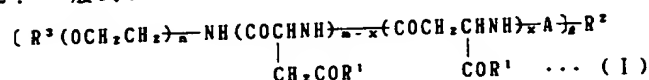
本発明者等は上述の目的に合致する新規な構造の高分子鎖を見出すべく種々研究を重ねた結果、薬物及び標的指向性物質を結合して薬理機能を発揮するセグメントと薬物及び標的指向性物が結合していない親水性セグメントとを有するブロック（又はグラフト）コポリマーが非常に優れた特性を有することを見出し本発明を完成した。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は下記の各発明を包含するものである。

1. 親水性セグメント及び薬物を結合せしめた薬理機能セグメントを有するブロック（又はグラフト）コポリマーの親水性セグメント以外の部位と標的指向性物質（即ち、生体内の所望部位又は成分に対して高い親和性を有する物質）とを直接又は結合鎖を介して結合させてなる標的指向性高分子医薬化合物。

2. 一般式(I)

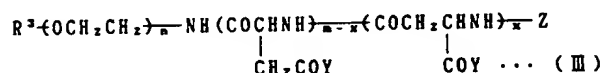


(式中、 $l$  は 1 ~ 30、 $n$  は 5 ~ 400、 $m$  は 1 ~ 300、 $x$  は 0 ~ 300 の整数を示し、 $R^1$  は分子中に  $m$  個あり、同一又は相異なって OH、及び薬物残基から選ばれる残基を示すが、 $R^1$  の少なくとも 1 個以上は薬物残基を示し、 $R^2$  は標的指向性物質残基を示し、 $R^2$  ないし  $CH_3$ 、 $C_2H_5$  などを示し、 $A$  は直接結合又は結合反応に用いられたカップリング剤に起因する結合鎖を示す。)

で示される上記 1 記載の標的指向性高分子医薬

リマーからなる標的指向性高分子医薬化合物合成用中間体。

9. 一般式(III)



(式中、 $n$  は 5 ~ 400、 $m$  は 1 ~ 300、 $x$  は零又は 1 ~ 300 の整数を示し、 $Y$  は同一又は相異なって OH 及び薬物残基から選ばれる残基を示し、

$Z$  は  $-COCH_2CH_2SH$  又は  $-COCH_2CH_2SS$



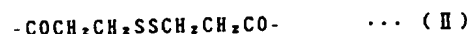
を示し、 $R^2$  は  $CH_3$ 、 $C_2H_5$  などを示す)

で示されるブロックコポリマー誘導体からなることを特徴とする上記 8 記載の標的指向性高分子医薬化合物合成用中間体。

本発明に於いて、親水性のセグメントとしては、例えばポリエチレングリコール、ポリサッカライド、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミノ酸等あるいはこれらの誘導体が

化合物。

3. 標的指向性物質が抗体であることを特徴とする上記 1 又は 2 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
4. 薬物が抗ガン剤であることを特徴とする上記 1 ~ 3 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
5. カップリング剤に起因する結合鎖  $A$  が式(II)



で示される 2 価の鎖条化合物残基であることを特徴とする上記 2 ~ 4 記載の標的指向性高分子医薬化合物。

6. 標的指向性物質残基  $R^2$  と結合鎖  $A$  との結合がアミド結合であることを特徴とする上記 2 ~ 5 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
7. 抗ガン剤がアドリアマイシンであることを特徴とする上記 4 ~ 6 記載の標的指向性高分子医薬化合物。
8. 親水性セグメントと薬物及び/又は標的指向性物質を結合する能力のある官能基保有セグメントとを有するブロック（又はグラフト）コポ


利用出来る。

薬物と結合して薬理機能セグメントを形成する成分としては、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリリシン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリリンゴ酸、ポリ乳酸、ポリアルキレンオキシド、長鎖アルコール等あるいはこれらの誘導体を利用出来る。

薬物としては、例えばアドリアマイシン、ダウノマイシン、メソトレキセート、マイトマイシン C 等の抗ガン剤、中枢神経系用薬、末梢神経系用薬、アレルギー用薬、循環器官用薬、呼吸器官用薬、消化器官用薬、ホルモン剤、代謝性医薬品、抗生物質、化学療法剤等が利用出来る。

標的指向性物質としては、温血動物又は人間由来のポリ（又はモノ）クローナル抗体、レクチン、ポリサッカライド、単糖、トランスフェリン等のような生体内の所望部位又は成分に対して高い親和性を有する物質が利用出来る。

標的指向性物質とコポリマーとの結合は、直接又は結合鎖を介して形成させることが出来る。例

えば、2-イミノチオレン、*n*-サクシニミジル 3-(2-ビリジルチオ)プロピオネート(SPDP)、サクシニミジル 4-(*p*-マレイミドフェニル)ブチレート等のカップリング剤を用いるか、還元剤などによって得た-SH基、-S-S-などの活性ジスルフィド基、マレイミド基等の間で結合を形成させることが出来る。

以下に、ポリエチレングリコール由来の親水性セグメント及び薬物として抗ガン剤アドリアマイシンを結合せしめたポリアスパラギン酸由来の薬理機能セグメントを有するブロックコポリマーと人間由来の免疫グロブリンG(抗体)とをカップリング剤(SPDP)を用いて結合させてなる標的指向性高分子医薬化合物を例にとり、本発明を詳細に説明する。この標的指向性高分子医薬化合物の構造概略図は第1図に示すとおりである。

この化合物の合成は、第2図の反応式に示すごとくβ-ベンジル L-アスパルテートN-カルボン酸無水物(BLA-NCA)を、片末端メトキシ基等のアルコキシ基、片末端1級アミノ基のポリエチ

レングリコール(分子量250~18000)を開始剤として重合させ、ポリエチレングリコールポリ(β-ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマー(PEG-PBLA)を得、次いでこのPEG-PBLAをアルカリ加水分解してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロックコポリマー[PEG-P(Asp)]を得る。このPEG-P(Asp)アスパラギン酸残基の80%がアルカリ加水分解の際にβ-アミド化している。

このPEG-P(Asp)の末端1級アミノ基にカップリング剤(SPDP)を反応させてカップリングのための官能基であるビリジルチオプロピオニル基(PDP)を導入し、(Ⅲ)式に於けるYがOHの本発明中間体[PEG-P(Asp)-PDP]を得る。この中間体に抗ガン剤アドリアマイシン(ADRI)と水溶性カルボジイミド(EDC)を加えることによりアドリアマイシンの1級アミノ基とポリアスパラギン酸のカルボキシル基との間にアミド結合を形成させて(Ⅳ)式に於けるYが薬物残基の本発明中間体[PEG-P(Asp(ADR))-PDP]を得る。

この薬物を導入した中間体をジチオスレイトール(DTT)で還元し、PDP鎖の-SS-結合を切断して-SHとした後、あらかじめカップリング剤(SPDP)によってビリジルチオプロピオニル基を導入してある人間由来の免疫グロブリンGと反応させ-SS-交換反応によって目的とする(Ⅰ)式の本発明標的指向性高分子医薬化合物[PEG-P(Asp(ADR))-IgG]を得る。

このようにして合成される本発明化合物のポリアスパラギン酸(P(Asp))部分の分子量は116~35,000まで可変であり、また、アドリアマイシンの置換率(アスパラギン酸残基に対して)はP(Asp)の分子量が1900の場合12~33mol%、また、10,000の場合3~37mol%のものを得ている。

免疫グロブリンG1分子に対して導入されたアドリアマイシン担持ブロックコポリマーの数は平均0.3から25個までのものを得ている。

合成した本発明化合物はいずれの場合も高いアドリアマイシン置換率にもかかわらず良好な水溶性を有しており、凍結乾燥したり濃縮したり(ア

ドリアマイシン換算20mg/ml)してもその水溶性は保たれた。

又、本発明化合物は、ブロックコポリマーと抗体との結合鎖中のジスルフィド結合が還元剤に対し、通常のジスルフィド結合に比較して著しく安定化されていた。

これらの理由は、化合物が水溶液中で分子中のアドリアマイシン結合部位及びジスルフィド結合部位の囲りをポリエチレングリコール鎖で包囲した状態のミセルとしてマイクロに凝集した結果、化合物の水溶性が保持されると共にジスルフィド結合が還元剤の攻撃から立体的に守られたためである。

このことは、アドリアマイシンに基づくケイ光がマイクロ凝集によって消光したことから示された。  
〔実施例〕

以下、本発明を更に詳細に説明するために実施例を示す。なお、以下の説明分中、化合物名又は化合物略記号の後に付した( )内の数字は本発明化合物の合成手順を示す第2図に於ける化合物

番号を示す。

#### 実施例 1

$\beta$ -ベンジル L-アスパルテート N-カルボン酸無水物(BLA-NCA)(2) 7.21gをN, N'-ジメチルホルムアミド(DMF) 12mlに溶かし、クロロホルム60mlを加える。片末端メトキシ基片末端アミノ基のポリエチレングリコール(分子量4300)(1) 6.00gをクロロホルム60mlに溶かしてその溶液をBLA-NCA溶液に加える。70時間後に反応混合液を2lのジエチルエーテルに滴下して沈澱したポリマーを濾過で回収して、ジエチルエーテルで洗浄した後に真空中で乾燥してポリエチレングリコール-ポリ( $\beta$ -ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマー(PEG-PBLA)(3)を得る。収量 10.09g (84%)。

PEG-PBLA(3) 10.03gを100mlクロロホルムに溶かす。水:メタノール:1-プロパノール=1:1:2(体積割合)に水酸化ナトリウムを0.43N溶かしたアルカリ混合液をPEG-PBLA溶液に加える。そのアルカリの添加量はPBLA部分のベンジルエス

テルの1.5倍当量になるようにした。0℃、10分攪拌後、2lのジエチルエーテルに滴下する。沈澱したポリマーを濾過して、20mlの蒸留水に溶かしてSpectrapor 7透析膜(分子量分画=1000)を用いて水中で39時間透析する。膜内の溶液を凍結乾燥してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロックコポリマー[PEG-P(Asp)](4a)を得る。収量 3.94g (49%)。

このブロックコポリマー鎖1本当たり、17個のアスパラギン酸残基があることがプロトンNMRの測定よりわかった。

PEG-P(Asp)ブロックコポリマー(4a) 1.022gをpH 9.5, 0.1M ほう酸ナトリウム緩衝液200mlに溶かす。N-サクシニミジル 3-(2-ビリジルチオ)プロピオネート(SPDP) 1.021gを10mlのDMFに溶かしたものを、室温10分間隔で等量ずつ2回に分けて(4a)の溶液に加えた。

2回目の添加から10分後に反応液を蒸留水中で一晩透析(スペクトラポア7の分子量カット1000の透析膜を使用)した後、セファデックス G-25

のゲルを充填したカラムで蒸留水中でゲル濾過し、凍結乾燥した。収量 523.1mg (収率51%)。

ブロックコポリマーのアミノ基末端に導入した3-(2-ビリジルジチオ)プロピオニル基(PDP)の定量は50mM ジチオスレイトールで還元した際に放出される2-ビリジンチオンの343nmの吸収により定量し、20%の末端にPDPが導入されていることが分かった。

ここで得た[PEG-P(Asp)-PDP]ブロックコポリマー(4b) 523.1mgを0.1M リン酸緩衝液(pH 7.5, 0.1M NaCl含有)(PBS) 5mlに溶かし、これに1, 4-ジチオスレイトール77.4mgを水1mlに溶かして加え、室温下20分間反応させて、ブロックコポリマー末端PDP鎖中のS-S結合を-SHに還元した。

還元反応後、透析(スペクトラポア7, 分画分子量1000の膜を使用, 蒸留水中)次いでゲル濾過(セファデックスG-25, 蒸留水中)して低分子物を除いたものをチオプロピルセファロース 6B(55ml, PBS中)のゲルカラムに通塔し、-SH末端を有するブロックコポリマーをこれに固定した。

ゲルカラムをPBSで充分洗浄した後、還元剤の2-メルカプトエタノール20mMを含むPBS 370mlを通塔し、固定したブロックコポリマー[PEG-P(Asp)-末端SH]を流出させ、凍結乾燥した。

透析(スペクトラポア7, 分画分子量1000, 蒸留水中)、次いでゲル濾過(セファデックスG-25, PBS中)して低分子物を除いて得たブロックコポリマー溶液40mlに、2, 2'-ジビリジルジスルフィド 199.8mgをエタノール20mlに溶かして加え、室温で2時間反応させた後透析、ゲル濾過して精製し、凍結乾燥した。収量31.9mg (収率6%)。ブロックコポリマー末端へのPDP基の導入率は前記と同じ方法で定量した結果48%であった。

PEG-P(Asp)-PDP(4b)へアドリアマイシン(ADR)を導入してPEG-P[Asp(ADR)]-PDP(6)を合成するため、アドリアマイシン塩酸塩 9.5mgをDMF 9.5mlに溶かし、これに1.3倍当量のトリエチルアミンを加えた。このアドリアマイシン溶液にブロックコポリマー(4b) 12.4mgを蒸留水0.4mlに溶かして加え、これに50mlの1-エチル-3-(3-ジ

メチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を加え、0℃で4時間反応させた。

さらに50mlのEDCを加えて室温で19時間反応させた。反応後、0.1Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)で3時間透析(スペクトラポア7, 分画分子量1000)し、セファデックスG-25でゲル濾過(0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液中、pH 4.5)して精製した。

得られたPEG-P[Asp(ADR)]-PDP(6)のADR導入率は485nmの吸収より求めた結果、ポリアスパラギン酸のカルボキシ基に対し約30当量%であった。

カップリングのための抗体へのPDP基の導入は人間のイムノグロブリンG(IgG, シグマ社製)35.2mgをPBSに溶かし、0.45μmのフィルターを通して凝集物を除き、セファデックスG-25カラムを通して低分子不純物を除いた後、SPDP(5)20mMを含むエタノール溶液146μlを加えて、室温で30分間反応させた。反応後ゲル濾過(セファデックスG-25, PBS中)してIgG-PDP(8)分画を得た。

PDP基の導入量は、前記の方法で求めた結果、

IgG1分子あたり3.5~5.6であった。

ブロックコポリマー(7){PEG-P[Asp(ADR)]-末端SH}とIgG-PDP(8)とのカップリングで目的とするPEG-P[Asp(ADR)]-IgG(9)を得る反応は、超音波照射を行った場合と行わなかった場合の2通り行った。

#### 4)超音波照射を行わない場合

0.40mgの結合ADRを含むPEG-P[Asp(ADR)]-PDP(6)をPBS 4.9mlに溶解し、100mMのジチオスレイトール水溶液250mlを加えて室温下20分間反応させて、PDP鎖中の-SS-結合を還元して末端-SH基のあるブロックコポリマー(7)に変換した後、ゲル濾過(セファデックスG-25, PBS中)して低分子物を除いた。この液にIgG-PDP(8)(IgG1分子当りPDP鎖5.6個含む)9.3mgをPBS 9mlに溶かして加え、室温で17時間反応させた。

反応後、反応混合物をゲル濾過(セファクリルS-200, PBS中)により分画し、各分画について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC){カラム:アサヒバックGS-520, 溶媒:0.1Mリン酸ナ

トリウム緩衝液(pH 7.5, 0.3M NaCl含有)}で分析した。

ゲル濾過の流出曲線は第3図に示し、HPLCによる分析チャートは第4図に示した。

第3図の105ml付近に流出する第1のピークは抗体と反応しなかったPEG-P[Asp(ADR)]-末端SH(7)のミセルのピークと一致した。第3図の第2のピークはHPLCによる分析の結果IgGとほぼ同じ分画に流出し、且つADRに基づく470nmの吸収を示したことから目的とする本発明の標的指向性高分子医薬化合物PEG-P[Asp(ADR)]-IgG(9)であることが確認された。

#### 4)超音波照射を行う場合

0.89mgの結合ADRを含むブロックコポリマー(6)をPBS 5.25mlに溶解し、100mMのジチオスレイトール水溶液250mlを加えて室温下20分間反応させてPDP鎖中の-SS-結合を還元して末端-SH基のあるブロックコポリマー(7)に変換した後ゲル濾過(セファデックスG-25, PBS中)して低分子物を除いた。

この液にIgG-PDP(8)(IgG1分子当りPDP鎖3.5個含む)12.6mgをPBS 10mlに溶かして加え、超音波照射(機種:Valet cell disrupter Model UCD 110)を1分間照射、1分間静置の繰り返しを行いながら、15℃で2時間反応させた。

反応後、反応混合物をゲル濾過(セファクリルS-300, PBS中)により分画し、各分画についてHPLC{カラム:アサヒバックGS-520, 溶媒:0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5, 0.3M NaCl含有)}で分析した。

ゲル濾過の流出曲線は第5図に示し、HPLCによる分析チャートは第6図に示した。

ゲル濾過の流出曲線は左に肩を持ったピークを示し、その前後を5個のフラクション(F1~F5)に分画して分析した。F1からF3には目的とするPEG-P[Asp(ADR)]-IgG(9)が流出し、その後に流出するF4とF5には抗体とカップリングしなかったブロックコポリマーPEG-P[Asp(ADR)]-末端SH(7)が低濃度のためミセルを形成すること無く流出した。



超音波照射の反応に及ぼす効果を調べるため、上記(イ)及び(ロ)で得た各フラクションについて、280nmと485nm(又は470nm)の吸収からカップリング効率及び取得した目的物の組成を調べ第1表に示す結果を得た。

カップリング効率は原料(7)中の全ADRに対する目的化合物(9)中のADRの比率(%)で示し、組成はADR/IgG及びPEG-P[Asp(ADR)]/IgGで示した。

第1表

区分	超音波照射	カップリング効率	複合体組成	
			ADR	PEG-P(Asp(ADR))
			IgG	IgG
(イ)	なし	26%	2.6	1.0
(ロ)	あり	59%	6.2	2.5

第1表の結果から明らかなように、超音波照射を行った方が高いカップリング効率を示した。その理由は、超音波照射により原料PEG-P[Asp(ADR)]-末端SH(7)のミセル構造が破壊されてIgGとの反応が起こりやすくなったためと考えられる。

その結果、単に放置した試料は、ピークが無処理の場合と変化せず、IgGの流出体積(と同じ場所)に流出した。このことは、ブロックコポリマーと抗体とを結合するジスルフィド結合がジチオスレイトールによって還元されなかったことを示すものである。一方、超音波照射した試料は一部のジスルフィド結合が切れて抗体から離れたPEG-P[Asp(ADR)]-末端SHがミセルを形成してIgGより先に流出した。

以上のことから、通常のジスルフィド結合が完全に解離するジチオスレイトールの存在下に於いても、本発明化合物PEG-P[Asp(ADR)]-IgG(9)中のジスルフィド結合は非常に安定であることが確認された。

なお、この試験に於けるゲル濾過型HPLCのチャートは第8図に示した。

#### 試験例2(ミセル安定性試験)

ADR、PEG-P[Asp(ADR)]及びPEG-P[Asp(ADR)]-IgGの3種の化合物を試料とし、それぞれの試料についてADR濃度が $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ Mの範囲の各種濃度の

得られた化合物が目的とするPEG[Asp(ADR)]-IgG(9)であることを確認するため、例と同じ条件で、末端にカップリングのための基を有しないPEG-P[Asp(ADR)]とIgGとを混合してHPLCで分析した結果、両成分は明瞭なピークで分離され、PEG-P[Asp(ADR)]はミセルとして流出し、IgGのピークを示す成分にはADRに基づく470nmの吸収が認められなかった。このHPLCチャートは第7図に示した。

#### 試験例1(耐還元剤安定性試験)

実施例で合成した本発明化合物PEG-P[Asp(ADR)]-IgG(9)(ADR  $1.87 \times 10^{-5}$ Mを含むPBS溶液600 $\mu$ lにジチオスレイトール100mMを含むPBS溶液600 $\mu$ lを加え、これを28℃で30分間放置した場合と超音波照射(機種: Valet cell disrupter Model UCD 100)を1分間照射、1分間静置の繰返しで25℃で35分間反応させた場合の2種の反応混合物を試料とし、ゲル濾過型HPLC[カラム: アサヒバックGS-520, 溶媒: 0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5, 0.3M NaCl含有)]で分析した。

試料溶液(pH7.4のリン酸等張液中)を調製し、それぞれの試料溶液について、ADRに起因する蛍光(励起: 471nm, 蛍光595nm)を測定した結果、PEG鎖の結合した試料溶液はADR溶液に比較して著しく蛍光強度が弱かった。

次に、上記3種の試料溶液にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を1%濃度になるように添加した後、上記と同様に蛍光を測定した結果、いずれの試料溶液も蛍光強度が著しく増加したが、その強度順位はADR>PEG-P[Asp(ADR)]>PEG-P[Asp(ADR)]-IgGであり、本発明化合物の蛍光強度が最も弱かった。

以上のことから、本発明化合物は溶液中でADRがPEG鎖によって包囲された状態のミセルを形成してADRに起因する蛍光強度が弱くなっており、そのミセルが界面活性剤(SDS)の添加によって破壊されることによって蛍光強度が増加したものと考えられる。

又、このミセルの形成が試験例1に於けるジスルフィド結合の安定性をもたらしていることも分かった。

〔発明の効果〕

本発明により、分子内に多量の薬物を結合させても水溶性が低下せず標的指向性物質を安定な結合で保持している新規な標的指向性高分子医薬化合物及びその合成中間体が提供された。

本発明の標的指向性高分子医薬化合物は、生体内の所望部位又は成分に向かって、多量の薬物を効果的に到達し、且つ抗原性が殆ど認められない優れた特性を有するものであり、今後の医療分野において多大の貢献が期待されるものである。

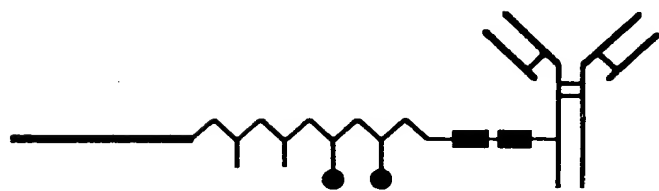
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の標的指向性高分子医薬化合物の構造概略図、第2図は本発明化合物の合成手順、第3図は本発明化合物を合成する際のブロックコポリマーと抗体とのカップリング反応を超音波無しで行った反応混合物のゲル濾過の流出曲線、第4図は第3図の流出フラクションを分析するためのHPLCチャート、第5図はブロックコポリマーと抗体とのカップリング反応を超音波照射下に行った反応混合物のゲル濾過の流出曲線、第6図は第

出願人 新 技 術 事 業 団

代理人 弁 理 士 平 木 祐 輔

第 1 図

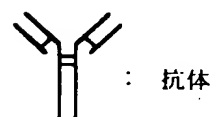


本発明化合物の構造概略図

— : ポリエチレングリコール

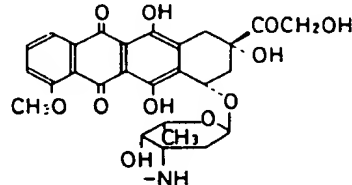
— : ポリアスパラギン酸

— : カップリング剤



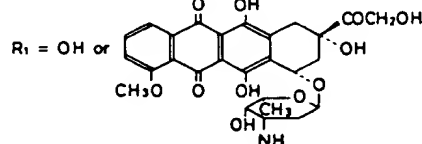
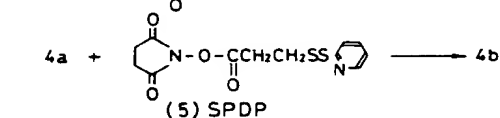
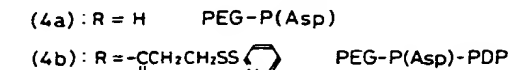
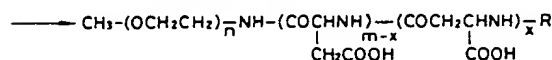
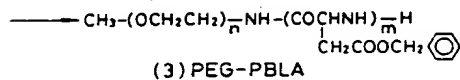
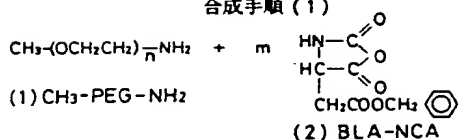
: 抗体

● : アドリアマイシン



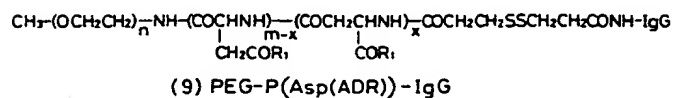
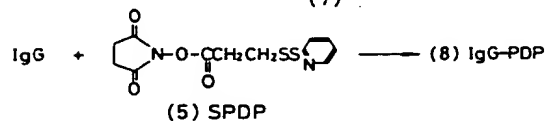
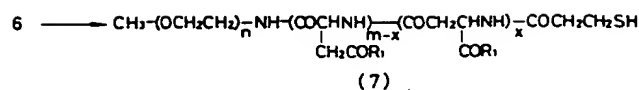
第 2 図 (A)

合成手順 (1)



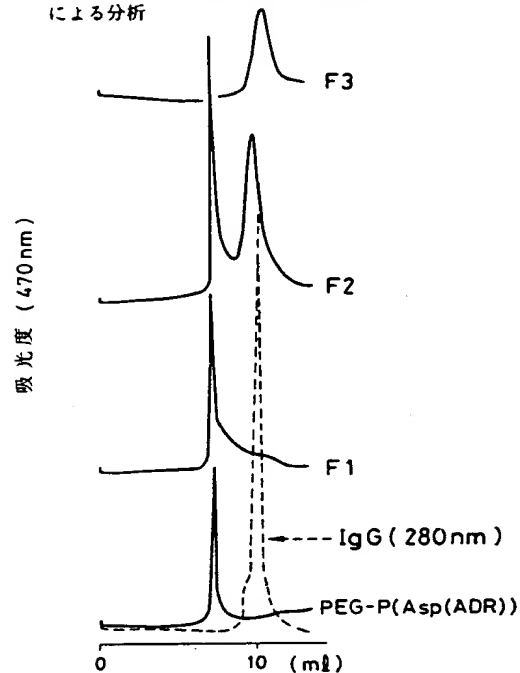
第2図(B)

### 合成手順 (2)



## 第 4 図

各フラクション(第3図)のゲル濾過型HPLCによる分析



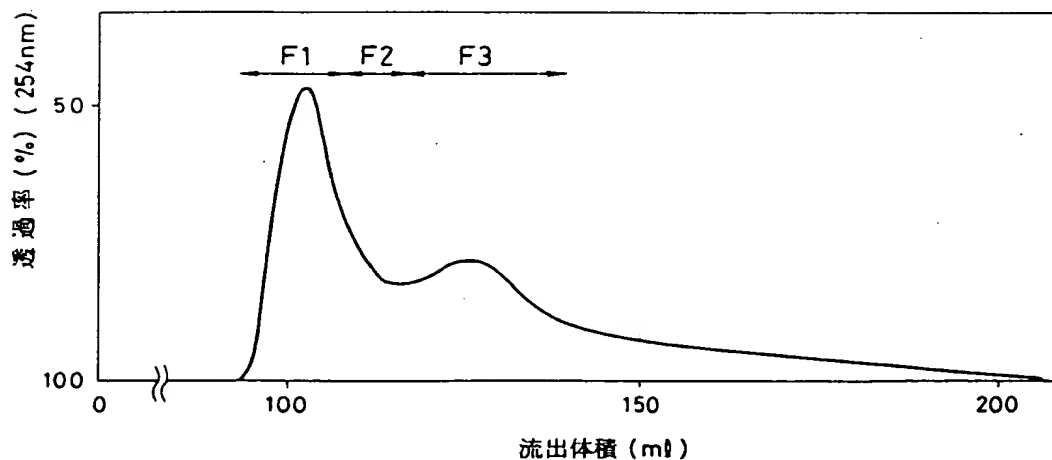
**流出体積**

カラム : Asahipak GS-520

流出溶媒：0.1M リン酸ナトリウム緩衝液  
(pH=7.5, 0.3M NaCl 添加)

第 3 図

### 超音波なしでの反応後のゲル濾過

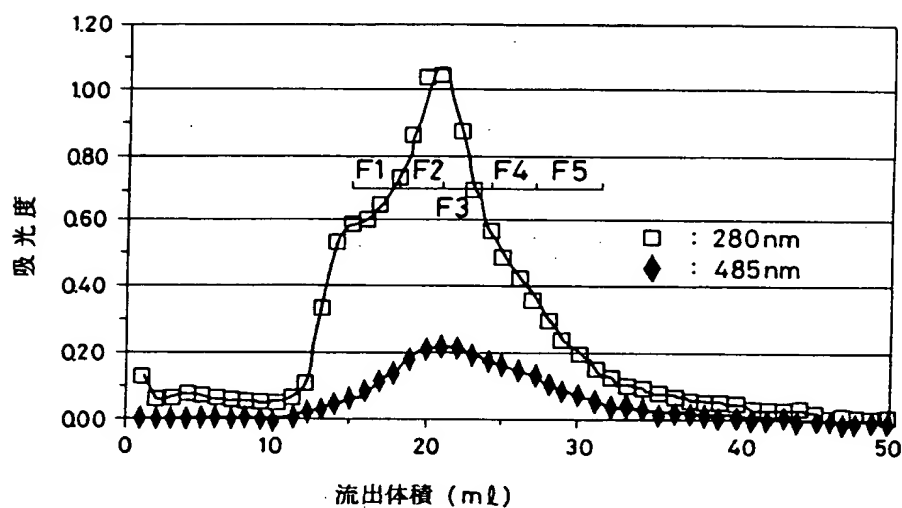


ゲル : Sephacryl S-200

流出溶媒： 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液  
(pH = 7.5, 0.1M NaCl 添加)

## 第 5 図

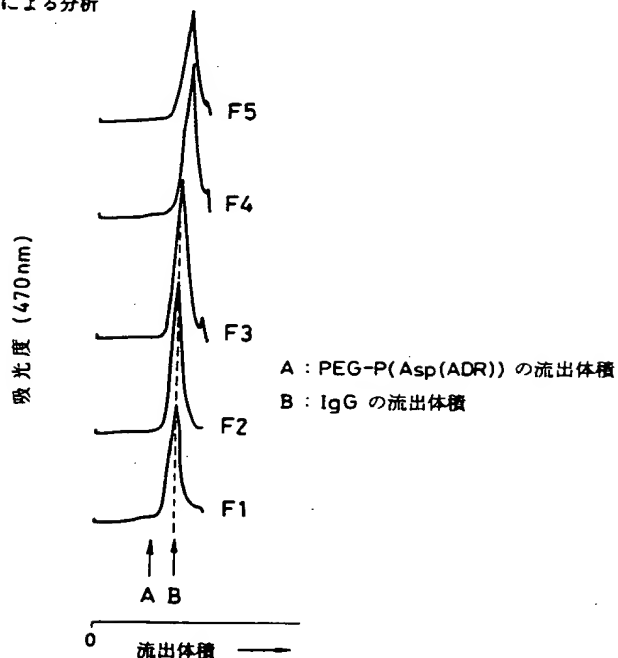
超音波照射下での反応後のゲル濾過



ゲル : Sephacryl S-300  
 流出溶媒 : 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液  
 (pH=7.5, 0.1MNaCl 添加)

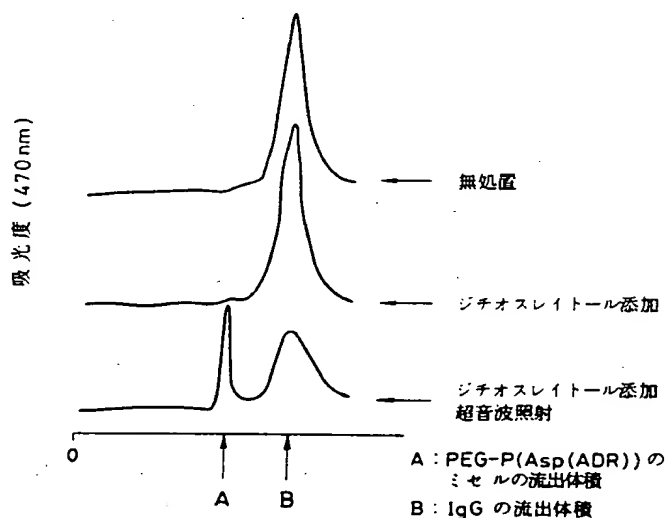
## 第 6 図

各フラクション第5図のゲル濾過後 HPLC による分析



カラム : Asahipak GS-520  
 流出溶媒 : 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液  
 (pH=7.5, 0.3MNaCl 添加)

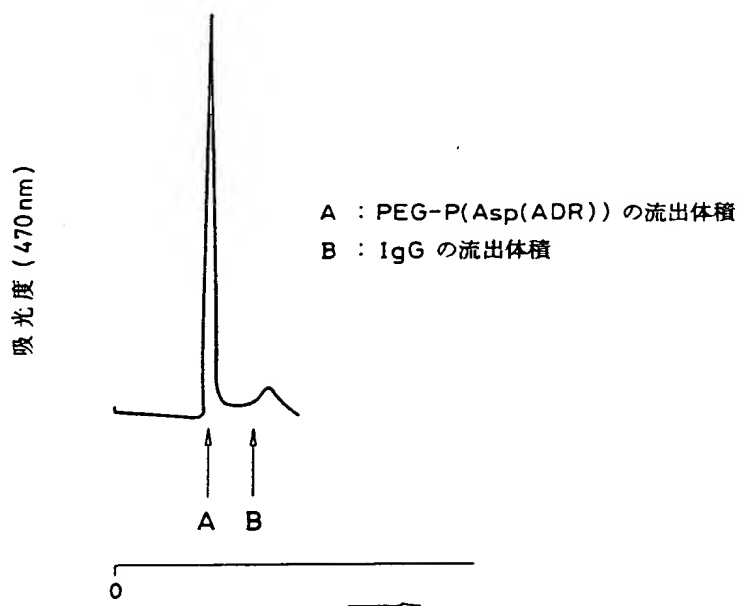
## 第 8 図

複合体中の-SS-結合の安定性の評価  
(ゲル濾過 HPLC による)

カラム : Asahipak GS-520  
 流出溶媒 : 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液  
 (pH=7.5, 0.3MNaCl 添加)

## 第 7 図

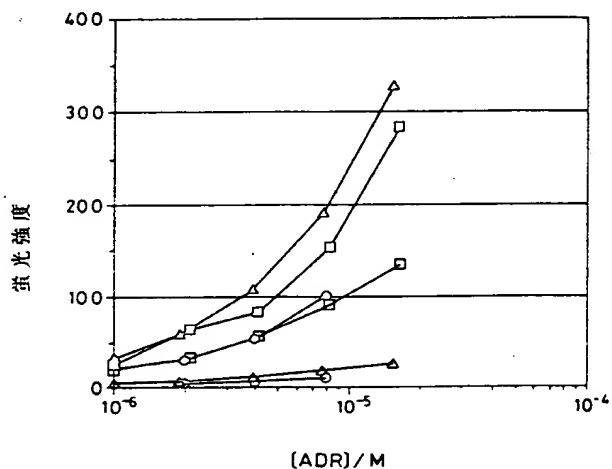
IgG と PEG-P(Asp(ADR)) の混合物の  
ゲル濾過 HPLC による分析.



カラム : Asahipak GS-520  
流出溶媒 : 0.1M リン酸ナトリウム 緩衝液  
(pH=7.5, 0.3M NaCl 添加)

## 第 9 図

蛍光強度の測定



pH 7.4 のリン酸等張液中  
励起 471 nm  
蛍光 595 nm

□ : ADR    □ : ADR + 1% SDS    △ : PEG-P(Asp(ADR))  
△ : PEG-P(Asp(ADR)) + 1% SDS    ○ : PEG-P(Asp(ADR))-IgG  
○ : PEG-P(Asp(ADR))-IgG + 1% SDS  
(SDS : ドデシル硫酸ナトリウム)